



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

PLA som metod för detektion av bornavirusinfektion hos katt

Urban Lundqvist

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2009:34

PLA som metod för detektion av bornavirusinfektion hos katt

Urban Lundqvist

Handledare: Mikael Berg, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

*Biträdande handledare: Jonas J. Wensman, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap
och Anne-Lie Blomström, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap*

Examinator: Sándor Belák, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Bornavirus, katt, vingelsjuka, diagnostik, PLA.

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2009:34*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ABSTRACT.....	1
SAMMANFATTNING.....	2
INLEDNING.....	3
Historik.....	3
Etiologi.....	3
Patologi och immunsvär.....	4
Antikroppsdetektion.....	6
Antigendetektion.....	6
PLA.....	6
SYFTE.....	8
MATERIAL OCH METODER.....	8
IFA.....	8
ELISA.....	8
RESULTAT.....	9
IFA.....	9
ELISA.....	10
DISKUSSION.....	10
TACK.....	12
REFERENSER.....	13

ABSTRACT

A method for intra vitam detection of bornaviral infection and diagnosis of bornaviral disease in the cat is currently lacking. The aim of this work was to explore the possibility of using the proximity ligation assay (PLA), with its capacity of recognizing femtomolar concentrations of a protein, as a method for detection of the minute quantities of antigen and antibodies that are present in the tissues and body fluids of a bornavirally infected cat. For this purpose reliable comparative assays, in the form of an ELISA and an IFA, had to be established. When this proved impossible within the time frame of the project, the aim of the study had to be abandoned, further underscoring the need for improved means of detection of bornaviral antibodies and antigen.

SAMMANFATTNING

Bornaviral sjukdom har varit vetenskapligt identifierad i snart hundra år och bornaviral sjukdom hos katt sedan mitten av nittiotalet. En rad metoder har använts för att konstatera bornaviral infektion hos katt i vitt skilda länder. En fungerande metod för in vivo diagnostik saknas dock till dags dato. De existerande metoderna för virusdetektion har inte heller den sensitivitet som krävs för att utgöra fullgoda verktyg, då nivåerna av såväl antigen som antikroppar hos infekterade katter är mycket låga. För att bättre vetenskapligt kunna undersöka bornavirusinfektion hos katt, samt även eventuellt erhålla ett fungerande diagnostiskt verktyg vid bornaviral sjukdom - vingelsjuka – hos katt, skulle det sannolikt vara nödvändigt att använda en metod som hade exceptionellt hög sensitivitet. En sådan metod finns numera tillgänglig i form av proximity ligation assay:en (PLA). Metoden bygger på att unika DNA-sekvenser skapas genom sammanlänkande av nukleotider fästa vid par av prober, till exempel antikroppar, som sammanförs genom sin gemensamma aviditet för ett sökt målprotein. De unika sekvenserna kan sedan förökas med hjälp av PCR-tekniken och en eventuell signal på så sätt förstärkas, så att en femtomolar koncentration av ett målprotein kan upptäckas. Syftet med föreliggande arbete var att pröva PLA-tekniken som metod för att påvisa bornavirusinfektion hos katt. För detta syfte var det nödvändigt att etablera tillförlitliga jämförelsemetoder. Dessa bestod av en ELISA och en IFA. Problem uppstod dock vid upprättandet av jämförelsemetoderna. ELISA:en gav en alltför hög bakgrundssignal, något som kvarstod trots ett flertal försök att modifiera den. Ej heller IFA:en kunde, av oklar anledning, bringas att fungera. Problemen med att upprätta tillförlitliga jämförelsemetoder medförde att huvudsyftet med arbetet, en första utvärdering av PLA som diagnostisk metod vid bornavirusinfektion hos katt fick uppges. Sammanfattningsvis torde arbete ytterligare understryka behovet av en förbättrad metod för upptäckt av bornaviralt antigen och antikroppar.

INLEDNING

Föreliggande examensarbete har utgjort ett led i försöket att hitta en bättre metod för att diagnostisera bornavirusinfektion/vingelsjuka hos katt.

Historik

Den sjukdom som motsvarar kattens vingelsjuka hos häst – bornasjuka - beskrevs för första gången 1660 och har sedan dess varit endemisk hos den centraleuropeiska hästpopulationen. Ett svårt utbrott av sjukdomen i Borna, Sachsen, i slutet av artonhundratalet, ledde till förstärkta ansträngningar för att förstå sjukdomen och 1924 kunde Wilhelm Zwick visa att sjukdomen förorsakades av ett dittills okänt infektiöst agens (Ludwig et al. 2000).

Fårvarianten, enzootisk encefalit, betraktades som en ekonomiskt viktig sjukdom hos får i början av förra seklet, och så är fallet ännu idag. Även nöt kan insjukna men detta är ovanligt jämfört med häst och får. I Israel kunde man 1993 visa att bornavirus var ansvarigt för en epidemi av neurologisk sjukdom hos strutsar. 1994 kunde bornavirusinfektion konstateras hos en hund i Sverige som betett sig aggressivt. I södra Tyskland där bornaviruset är endemiskt har sedermera 40 % av provtagna hundar visat sig positiva för BDV-infektion (Ludwig et al. 2000).

Viruset har också kunnat påvisas hos vilda djur. Bornavirusinfektion har kunnat konstateras hos ett lodjur (Degiorgis et al. 2000). Näbbmöss i Schweiz som visades vara infekterade med bornavirus tros kunna tjäna som reservoar för viruset (Hilbe et al. 2006). I Finland har man sett att sorkar varit bärare av viruset (Kinnunen et al. 2007). Det är för närvarande kontroversiellt huruvida människan är bärare av bornaviruset och vilka de eventuella patologiska implikationerna av detta i så fall skulle kunna vara.

Ihlenburg och medarbetare konstaterade redan på 50-talet att katt kunde infekteras experimentiellt med bornavirus (Ihlenburg et al. 1966). Kronevi och kollegor beskrev i mitten av sjuttioalet en rad fall av icke-suppurativ meningoencefalomyelit hos katter i Mälardalen, som gavs namnet vingelsjuka (Kronevi et al. 1974). På 90-talet visade Anna-Lena Lundgren (1995) att vingelsjuka hos katt kunde härledas till naturlig infektion med bornavirus.

Ett antal ”in-house”-metoder har använts för att påvisa bornavirusinfektion hos katt på så skilda platser som Storbritannien, Turkiet, Japan och Österrike (Kamieh et al. 2006). Ännu saknas dock en säker och användbar metod att tillgå för klinikern för att ställa diagnos med, då hon står med en katt framför sig som uppvisar för vingelsjuka typiska symptom. Så länge detta saknas kommer det också att vara svårt att få en uppfattning om sjukdomens prevalens i dagens kattpopulation. Från kliniskt håll har framhållits att det sannolikt föreligger en underdiagnostisering av fall av vingelsjuka hos katt (muntlig kommunikation med Sara Fors).

Etiologi

Vingelsjuka är namnet på den icke-suppurativa meningoencefalomyelit hos katt som orsakas av Bornaviruset (BDV). Bornaviruset är ett enkelsträngat, icke segmenterat negativ-RNA-virus med ett genom på 8900 baser, som fått sin egen familj inom släktet Mononegavirales. De 8900baserna ger åtminstone 6 stycken öppna läsramar som kodar för ett nukle-

oprotein p40, ett fosfoprotein p24, ett matrixprotein gp18, ett fodral- (membranglykoprotein)protein – gp 94 och en förmodad RNA-polymeras - p190. ytterligare en läsram kodar för proteinet p10, av ännu osäker funktion, men senare studier visar på dess roll i virusinducerad apoptos (Poenisch et al., 2009). Viruset replikerar, till skillnad från andra medlemmar av släktet Mononegavirales, i värdcellens kärna. De proteiner som uttrycks rikligast är p40 och p24-proteinerna (Kamieh et al 2002; Nishino et al 2002). Bornaviruset karakteriseras av extremt hög genetisk stabilitet (Tomonaga et al. 2002) vilket antyder att viruset har haft en lång tid för anpassning till sina värdorganismer (Ludwig et al. 2000).

Patologi och immunsvär

Möss som inokulerats svarar väldigt olika beroende på ålder vid inokulation. Nyfödda råttor blir persistenta, symptomlösa bärare av viruset medan möss i mogen ålder blir kroniskt infekterad och dör sjuka. Hos både möss och råttor kan även ett obesitassyndrom utvecklas. Symptomens svårighetsgrad var också relaterad till det faktum att virulensen hos viruset ökade med antalet passager (Ludwig et al. 2000). Hos råttor har man kunnat konstatera att immunsvaret i den akuta fasen av sjukdomen fram för allt är cellulärt. Det humoral svaret hör mer till den kroniska fasen (Johansson et al. 2002).

Ett obesitassymptom har även kunnat konstateras hos katt (Lundgren 1995). Den kliniska bilden vid konstaterad BDV-infektion hos katt har annars varit varierande, från inga eller ytterst lindriga symptom, till sjukdom som varit dödlig inom loppet av någon till några veckor, och patologin är ännu inte fullkomligt utredd vad beträffar orsakerna till varför individuella katter tycks svara olika på infektion med BDV.

Vid den typiska kliniska bilden vid vingelsjuka hos katt inleds förloppet av en period med ospecifika symtom – feber, anorexi och trötthet varefter inträder neurologiska symptom i form av ataxi, i synnerhet hos bakbenen, med stel och bredbent gång och svårigheter att hoppa upp och ned. Ibland kan katten inte dra in sina klor. Beteendeförändringar i form av ökad tillgivenhet eller ökad aggressivitet förekommer ofta. Andra förekommande symptom utgörs av klåda, överkänslighet för beröring, ökad salivering, nedsatt syn, stirrande blick, förstoppning, tremor, cirkelgång och krampanfall. Inom tre till fyra veckor brukar symptomen aggraveras eller stabiliseras. I sällsynta fall sker ett fullkomligt tillfrisknande (Lundgren et al. 1997).

Histopatologiskt kännetecknas vingelsjuka av en icke-suppurativ meningoencefalomyelit bestående i perivaskulära manschetter av mononukleära celler i Virchow-Robin-rummet framförallt lokaliserade till den grå substansen i hjärnstammen, basalganglierna och hippocampus. Neurondegeneration och neuronofagi förekommer också. Meningit förekommer över hela hjärnan men är särskilt uttalad över cerebrala cortex och cerebellum. Ryggmärgen och dess meninger är endast i ringa grad inflammatoriskt förändrade (Lundgren 1992).

Katter som infekterats experimentellt har reagerat mycket olika på detta. Av 8 specifikt patogenfria katter som infekterats med V stammen, en variant hämtad från häst (4st), och felint BDV från en katt med vingelsjuka (4st), visade en katt i den första gruppen efter 15 dagar framfall av tredje ögonlocket och den jamade också mer. Den utvecklade under de följande två veckorna ytterligare neurologiska symptom i form av ökad skygghet, cirkelgång och ataxi. Kattens tillstånd normaliserades därefter, bortsett från en viss tendens till hyperestesier och en röstförändring vilken kvarstod 158 dagar efter inokulationen. En annan katt i denna grupp visade stel gång och ataxi två och en halv månad efter inokulationen, symptom som blev bestående tills katten avlivades (Lundgren et al. 1997).

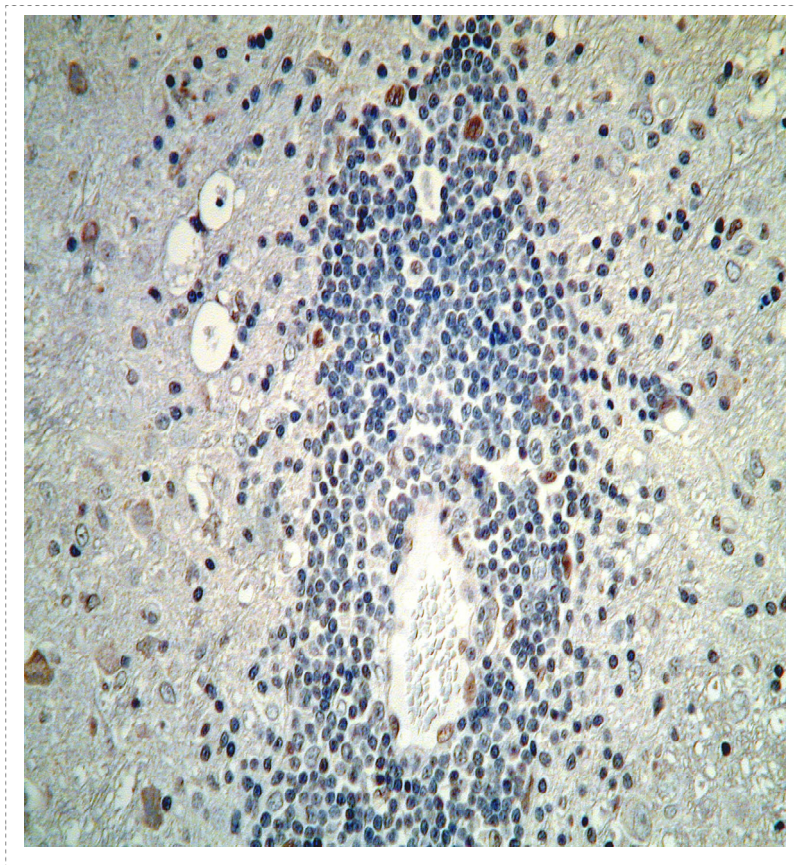


Fig.1. Manschetter av mononukleära celler runt blodkär i hjärnan är en typisk bild vid ett flertal virala encefaliter. En lokalisering av dessa till hjärnstammen och limbiska systemet är dock typisk för bornaviral encefalit hos katt.

I den grupp som infekterats med den felina varianten visade en katt på första dagen efter inokulationen tachypneé och nedsatt proprioception hos frambenen. Symptomen försvann helt efter två dagar och ansågs vara följden av trauma vid inokulationen. En annan katt i denna grupp visade efter ett par veckor bilateralt framfall av tredje ögonlocket. En tredje katt i denna grupp utvecklade efter två och en halvmånad rörelsestörningar som bestod i att den höll nacken i ett stelt läge och i att den visade ryckighet vid huvudvridning. Den utvecklade även viss bakkensataxi. Symptomen kvarstod tills katten avlivades efter 158 dagar (Lundgren et al. 1997).

Samtliga infekterade katter serokonverterade till skillnad från katter i en kontrollgrupp. Antikroppar kunde dock först uppmätas 25 dagar efter inokuleringen, alltså 11 dagar efter det att kliniska symptom på sjukdom först upptäckts hos någon av katterna (Johansson et al. 2002). De ökade sedan och kulminerade efter 3 - 4 månader. Katterna som infekterats med kattvarianten hade i genomsnitt högre titrar än variant V infekterade. I ett av fallen sammanträffade produktionen av neutraliserande antikroppar med ett tillfrisknande från akut sjukdom. Hos de två andra påverkade katterna var detta mindre tydligt (Lundgren et al. 1997).

Det inflammatoriska mönstret i hjärna i denna studie skilde sig från det som ses vid naturlig vingelsjuka där framför allt limbiska systemet och hjärnstammen är påverkade, något som skulle kunna bero på skillnaden i infektionsväg. Vid naturlig infektion tros virus nå hjärnan via luktnerverna. En annan möjlig förklaring var att den histopatologiska under-

sökningen genomfördes efter 5-6 månaders sjukdom, medan naturligt infekterade katter undersöks histopatologiskt i det akuta skedet (Lundgren et al. 1997).

Naturligt infekterade katter utvecklar ej neutraliserande antikroppar och studier antyder att reaktionerna vid naturlig infektion och experimentell skiljer sig (Ludwig et al. 2000). Av de 24 katter som kliniskt diagnostiserats som vingelsjuka och som Lundgren (1993) undersökte visade 19 icke suppurativ meningoencefalit, dock kunde det indirekta antikropps-IFA test som användes endast påvisa BDV- antikroppar hos 44 % av dessa. Hos sex kontrollkatter kunde antikroppar påvisas hos en, d.v.s. 17 %. Det humoral immunsvaret hos katt är tydligare i cerebrospinalvätskan än i blodet (Johansson et al. 2002).

Prevalensen av infektion hos såväl asymptomatiska som symptomatiska katter har varierat vid olika undersökningar. En undersökning av asymptomatisk katter i Tyskland gav 18 % positiva med antikropps-IFA medan en annan undersökning med antikropps-Elisa gav 8,5 % positiva (Kamieh et al., 2006). En undersökning i Japan av slumpmässigt utvalda katter intagna på klinik med hjälp av immunoblottnings gav 18 % positiva katter (Nishino et al. 1999) medan en annan japansk studie gav en seroprevalens av 8,4 % (Nakamura et al. 1996). En japansk studie som använde sig av elektrochemiluminescens uppmätte antikroppar hos ca tre procent av katterna (Horii et al. 2001). Ytterligare en japansk studie visade att man med hjälp av immunoblottnings kunde påvisa antikroppar mot de virala p10 och p24 proteinerna hos 23,7 % av katter utan neurologisk sjukdom och hos 46,2% av katter med neurologiska symptom (Ouchi et al. 2001). En turkisk studie genomförd med hjälp av en ELISA baserad på rekombinanta proteiner visade att 41,6 procent av katter utan neurologiska symptom bar på antikroppar, medan två tredjedelar av katter med neurologiska symptom bar på antikroppar mot viruset (Helps et al. 2001). Man har i undersökningar också kunnat påvisa att katter som har antikroppar mot FIV är närmare tre gånger mer sannolika att även vara infekterade med BDV än katter som saknar antikroppar mot FIV (Helps et al 2001; Huebner et al. 2001).

Antikroppsdetektion

Naturligt infekterade katter bildar antikroppar främst mot det virala fosfoproteinet p23 (Lundgren et al. 1995) och i mindre utsträckning mot nukleoproteinet p40. Detta gäller både serum och CSF. Dock är immunsvaret betydligt svagare än hos häst och titrarna låga i förhållande till bornasjukan hos detta djurslag (Ludwig et al. 2000). De metoder som använts har bl. a. varit antikropps-IF, immunoblottnings, elektrochemiluminescens, rekombinant ELISA. De rekombinanta proteiner som används i detta sammanhang utgör dock ett svagt verktyg både vad beträffar sensitivitet och specificitet (Kamieh et al. 2002).

Antigendetektion

Att upptäcka antigenet möter samma svårigheter som antikroppsdetektion då nivåerna är låga i blodet. Detta gäller även för mer sensitiva metoder som RT-PCR (Kamieh et al 2002) Låga nivåer i hjärnvävnad (Ludwig et al. 2000) skapar också problem för post mortem diagnos med hjälp av immunohistokemi och in situ hybridisering.

PLA

Då såväl antikropps- som antigennivåer är låga vid en naturlig infektion med BDV behövs en diagnostisk metod som ger möjlighet att detektera även de ytterst små förekomster av antikroppar/antigen som förekommer hos en naturligt infekterad katt.

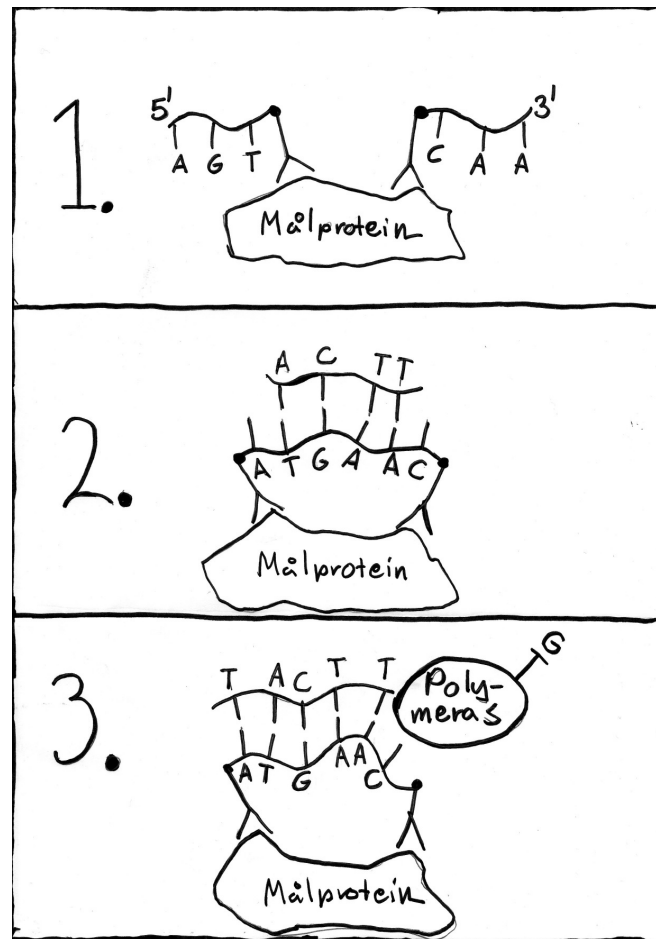


Fig. 2. Principen för PLA: 1. Oligonukleotidkonjugerade antikroppar binder till målmolekylen. 2. Kompletterande oligonukleotider kan nu förenas med hjälp av en DNA-”splinta”. 3. Första cykeln i en PCR som uppökra signal-DNA-sekvensen till mät- och kvantifierbar mängd.

En sådan metod skulle PLA (proximity ligation assay) kunna utgöra. Metoden som presenterats av Simon Fredriksson och medarbetar (Fredriksson et al. 2002), bygger på att antikroppar fästs vid en unik syntetisk oligonukleotid, varje antikropp binder sedan till varsin epitop på proteinet. När proverna har bundit till antigenet, fogas de samman med hjälp av en tredje oligonukleotid (splint) som hybridiserar till ändarna på oligonukleotiderna fästade på antikropparna. Hybridisering sker endast om proverna har bundit till samma antigen, och följaktligen är i varandras närhet. Ligas tillsätts sedan och oligonukleotiderna som hålls samman av splintan binds kovalent till varandra. Så bildas en kontinuerlig DNA-molekyl som sträcker sig från en antikropp till den andra. Denna nyformerade DNA-sekvens kan sedan förstärkas, upptäckas och kvantifieras med hjälp av realtids-PCR. Man kan på så sätt upp täcka ned till femtomolara koncentrationer av ett protein (Gustafsdottir et al. 2005).

Det var ambitionen att inom ramen för detta arbete försöka detektera bornavirusinfektion hos katt med användande av PLA-tekniken. För detta syfte skulle en sandwich-assay ha upprättats där oligonukleotider länkats till antikroppar med hjälp av biotin och streptavidin. Virala antikroppar skulle sedan ha fångats upp av rekombinant bornavirus protein bundet till en solid fas. Efter blockering och tvättning skulle par av oligonukleotid konjugerade sekundärantikroppar tillsatts och inkuberats med provet. Efter förnyad tvättning skulle se-

dan ha tillsatts en förbindelseoligonukleotid (splint) tillsammans med övriga komponenter nödvändiga för ligering. Efter förstärkning genom PCR skulle sedan produkten kunnat upptäckas och förekomst och mängd av BDV-antikroppar analyserats. Det var även planerat att försöka sätta upp en assay som utnyttjade oligonukleotidkonjugerade rekombinanta P40 och p24 proteiner som skulle bringas i varandras närhet av BDV-antikroppar som på så sätt skulle kunna upptäckas.

Plan fanns också för försök till in situ detektion av BDV med hjälp av polyklonala BDV-antikroppar till vilka oligonukleotider skulle ha länkats kovalent för detektion med den ovan redovisade tekniken.

SYFTE

Syftet med arbetet har varit att pröva PLA-tekniken som metod vid diagnostisering av bornaviral infektion hos katt. För detta syfte har det varit nödvändigt att sätta upp tillförlitliga jämförelse metoder i form av en ELISA och en IFA enligt tidigare (Johansson et al., 2002).

MATERIAL OCH METODER

Som jämförelse metoder mot vilka PLA – metodiken skulle testas utprovades en ELISA och indirekt IFA

IFA

Metoden utnyttjade råttastrocytomceller (C6) som odlats i flaska med hjälp av näringslösning och infekterats med BDV. Som kontroll användes oinfekterade C6 celler. Cellerna och näringslösning överfördes därefter till glas-slides med åtta brunnar, i vilka de fick fästa och tillväxa under två dygn. Därefter fixerades cellerna under 15 min med hjälp av aceton och lagrades vid – 70 grader tills användning. Brunnarna blockerades med normalt getserum spätt 1:50 i PBS 0,05 % Tween20 under 30 minuter i 37 grader. Plattorna inkuberades med BDV-positivt kaninserum spätt 1:10, 1:100, 1:1 000 och 1:10 000 i TBS-T. 1 mikroliter av varje spädning blandades med 1 mikroliter getserum och 38 mikroliter TBS-T och 35 mikroliter av suspensionen tillsattes sedan i varje brunn. Sliden inkuberades därefter i en timme vid 37 grader, varefter de tvättades 3x2 minuter i TBS-T och sedan inkuberades med FITC-konjugerad get-anti-kanin-antikropp, 1h vid 37 grader. Efter PBS-tvätt 2x3 min sattes täckglas och de undersöktes sedan genom flouescensmikroskopering.

ELISA

ELISA:n använde en coating med rekombinant BDV-protein som hade framställts genom att cDNA tillverkades genom reverstranskription av det totala RNA:et från virus från hjärnan på en häst med konstaterad bornasjuka. Därefter utfördes PCR med primers gjorda för att möjliggöra uttryck av fullängds p23 och p40 proteiner i olika system. De renade PCR produkterna ligerades till en GST-gen- fusionsvektor. Dessa insattes i E-colibakterier som fick uttrycka de ifrågavarande proteinerna. Samma framställningsmetod hade använts vid framställningen av det protein som fungerade som negativ kontroll i ELISA:n, ett protein från ett porcint rubulavirus, La-Piedad-Michoan-Mexico viruset (LPMV) (Berg et al., 1998).

Vid utprovningen av ELISA:n användes serum med polyklonala antikroppar framställt genom att de rekombinanta GST-proteinerna BDV p24 och BDV p40 inokulerades på kaniner.

ELISA:n utnyttjade Nunc polysorbplattor som cotades med ovannämnda proteiner spädda i 50mM Tris-HCl pH 9,5. Olika spädningar av coatningsproteinerna: 25, 50, 100, 250 och 500 ggr prövades. 100ml av p40, p23 och det negativa kontroll proteinet tillfördes varje brunn i parallella rader och plattan inkuberades sedan 1h i 37 grader. Därefter tvättades plattan tre gånger med 0,05 % tween i avjonat vatten och brunnarna blockerades med 0,5 % BSA i PBS, 200mikroliter per brunn. Sedan testproverna av kaninserum späts 10000, 100000, respektive 1000000 gånger i 5 % getserum i PBS tillsattes 100ml per brunn. Plattan inkuberades en timme vid 37 grader. Efter tvätt tre gånger med samma tvättlösning som ovan, tillsattes peroxidaskonjugerad sekundärantikropp spädd 2000 gånger i 5 % getserum i PBS varefter inkubering skedde en timme vid 37 grader. Efter ytterligare en tvätt fem gånger med tvättlösningen fick peroxidasen reagera 10 min vid rumstemperatur med en lösning bestående av 20 delar kalciumcitrat och en del TMB, 200 mikroliter per brunn, varefter reaktionen avbröts genom tillsatts av svavelsyra, 100 mikroliter per brunn. Plattorna lästes av med hjälp av en ELISA-läsare vid 450nm.

En rad olika modifikationer av protokollet vidtogs senare; genom att blockeringen med BSA/PBS ersattes med blockering med 2 % mjölkpulverlösning. En blockering med 5 % mjölkpulverlösning prövades också. Både orenat protein och protein renat genom tvätt med glutathionsefaros med GST bortklivet med hjälp av thrombin testades vid coatningen. Olika reduktioner av tiden för reaktion mellan substrat och peroxidas prövades också.

Provspädningarna av proteiner och primärantikroppar gav vid handa att de optimala spädningförhållandena för att erhålla maximal skillnad i optisk densitet mellan positiva och kontroller var att späda orenat p23 protein 250 gånger. För att ytterligare minska bakgrundseffekten tillsattes get-anti-GST-antikroppar vid coatningen. Primärantikropp anti-p23 spädd 10000 gånger och som blockering 2 % mjölkpulver var i övrigt de koncentrationer som användes vid en preliminär mätning på sera från infekterade katter. Som sekundär antikropp användes get-antikatt-IgG.

För att skapa kriterier för positivitet respektive negativitet användes en metod där provresultatet uttrycks som procent positivitet. Denna erhålls genom att det för provet erhållna optiska densitetsvärdet (OD) som detta får i den brunn som coatats med det negativa kontrollantigenet subtraheras från OD-värdet provet erhåller i den brunn som coatats med antigen från det sökta smittämnet. Denna differens jämförs sedan med motsvarande värde erhållet för ett känt positivt kontrollserum, genom att divideras med detta. Den kvot som man får på så sätt multipliceras med hundra. Om produkten - procenten positivitet - är större eller lika med 14 anses provet vara positivt, om mindre, negativt. För att metoden skall anses användbar finns även kriterier för minimumdifferensen mellan OD-värdet för det känt positiva och det känt negativa provet.

RESULTAT

IFA

Då det protokoll som inledningsvis användes gav ett negativt resultat prövades ett modifierat protokoll (det ovan redovisade). Det ursprungliga protokollet använde sig av PBS med 0,1 % triton-x för blockering under endast tio minuter i förhållande till 30 min i det senare.

Enligt det första protokollet tvättades också brunnarna mellan blockeringen och tillsatsen av primärantikropparna. Dessa späddes i det förra fallet med fetalt kalvserum och inkubationstiden var 30 min istället för en timma. Även sekundärantikropparna fick i det modifierade protokollet reagera en halvtimme ytterligare i förhållande till det ursprungliga protokollet. I det ursprungliga protokollet skedde heller ingen tvätt av slidesen innan dessa sattes att torka. Förändringarna i protokollet påverkade dock inte utgången av försöket då fortfarande ingen av spädningarna gav upphov till någon fluorescens i någon av brunnarna som innehöll positiva celler.

ELISA

Resultaten av den inledande ELISA:en gav en skillnad i den optiska densiteten på omkring 1000 % mellan å ena sida renade p40 proteiner och kontroll proteinet och å andra sidan renade P23-proteiner alla spädda 250 ggr, vid tillsats av anti-p23-antikroppar spädda 10 000 ggr, medan motsvarande anti P40-suspension gav högre OD-värden för p23-coatade brunnar än för kontrollproteinets och p40. Signalen för p40 och kontrollproteinets var ungefär densamma. Motsvarande differenser för orenade proteiner var i det närmaste desamma vid tillsats av anti-p23-suspensionen. Tillsats av anti-p40-suspension gav här en 100 % starkare signal för P40-coatade brunnar i förhållande till brunnar coatade med p23 eller kontrollproteinets.

En modifierad ELISA som utnyttjade en blockning med 5 % mjölkpulversuspension gav positiva differenser på som mest 75 % för anti – p23-suspension och negativa differenser för anti- p40 suspension. En ELISA som jämförde 1 % med 2 % mjölkpulversuspension som blockering gav en hundra procentig differens för anti-p23-suspensionen både för orenade och renade proteiner och inga differenser för anti-p40.

Ytterligare försök gav resultat präglade av inkongruens och anomali varför bestämdes att återgå till det ursprungliga protokollet med användande av orenat protein.

En ELISA som jämförde anti-p23 mot ett negativt kontrollserum visade klarast differens för anti-p23 spätt 10 000 ggr mot en coating av orenat p23, vilket gav en något under 100 % starkare signal än för de negativa kombinationerna, vilka dock alla gav upphov till en absorbans av betydande storlek.

Olika tider för reaktion mellan enzym (peroxidas) och substrat (kalciumcitrat/TMB) prövades även för att på så sätt maximera skillnaden i absorbansdifferensen mellan positiva och negativa prover, där sex minuter gav den största skillnaden med en ca 2000 % starkare signal för den positiva kombinationen.

Gemensamt för de olika ELISA:orna var att absorbansvärdena för de olika negativa kombinationerna sällan understeg 0,3 enheter.

När ELISA:en testades på sera från vingelsjuka katter kunde dock denna inte påvisa någon skillnad i optisk densitet för dessa och för negativa kontrollprover.

DISKUSSION

Då de diagnostiska jämförelsemetoderna, trots långvariga ansträngningar, inte kunde bringas att fungera, blev det på grund av tidsbrist nödvändigt att uppgge arbetets primära

målsättning – en första utvärdering av PLA som möjlig metod vid diagnostisk av vingelsjuka hos katt.

Huvudproblemet med en allt för hög bakgrundssignal kunde inte lösas med hjälp av de olika blockningssuspensionerna som användes - BSA, 1 %, 2 % eller 5 % mjölkpulversuspension gav alla en bakgrundssignal som bedömdes som alltför hög för att ELISA:en skulle fungera som en bra jämförelsemetod för en PLA. Inte heller försöken att minska bakgrundssignalen genom tillsatts av antikroppssuspension reducerade bakgrundssignalen till en acceptabel nivå. Som tidigare nämnts prövades även ett protokoll där förcoatning gjordes med get-anti-GST-suspension, för att i möjlig utsträckning minska den ospecifika bindningen. Dock påverkades bakgrundssignalen inte i signifikant utsträckning av detta.

Sannolikt är orsakerna till den höga bakgrundssignalen att söka i en ospecifik bindning hos primärantikropparna. Det förhållande att bindningen inte i större utsträckning kunde påverkas genom de förändringar i blockeringsförfarandet som vidtogs, antyder kanske att denna ospecificitet hos antikropparna även omfattar viss aviditet för de negativa proteiner som användes i ELISA:en. Det negativa serumet som användes för att pröva ELISA:en visade större aviditet för p23 än för p40 och LPMV-proteinet. Dock var aviditeten för samtliga proteiner hög med OD-värden/absorbans på 1-0,3 absorbansenheter.

Den omständigheten att en 2000 % starkare signal i vissa fall kunde erhållas för kombinationen anti-p23/p23, visar att aviditeten för det egna proteinet är så mycket större att ELISA:en skulle ha kunnat fungera för att skilja positiva från negativa sera under vissa omständigheter. Dess värre sannolikt inte under de omständigheter som skulle föreligga om man ville mäta sera från naturligt infekterade katter eftersom titrarna antagligen skulle vara låga, vilket skulle medföra att bakgrundseffekten skulle vara relativt mer betydande, något som sannolikt också märktes vid testen av ELISA:en mot sera från naturligt infekterade katter. Detta förhållande pekar ytterligare på behovet av en diagnostisk metod som är känslig även för de låga titrar som man har att göra med hos naturligt infekterade katter.

Som redovisats ovan försöktes en rad metoder för att begränsa den ospecifika bindningen, allt utan större framgång. För IFA:en var problemet det motsatta, i det att alla försök och modifikationer av protokollet utföll med att ingen fluorescens alls kunde påvisas. Anledningen till detta är oklar. Båda metoderna har dock fungerat i många andra sammanhang, vilket ger anledning att tro att de kommer att kunna användas vid ett framtida försök till utvärdering av PLA som diagnostisk metod vid misstanke om vingelsjuka hos katt.

De nivåer av antikroppar i blodet som förekommer hos naturligt BDV infekterade katter är mycket låga. Även nivåerna av antigen i blod är mycket låga vilket gör det svårt att påvisa dessa även med mer sensitiva metoder som RT-PCR. I CSF förekommer något högre titrar. Här tillkommer dock även andra negativa faktorer, sådana som att provtagning av CSF är mindre praktiskt och innebär större risker för patienten än att ta ett blodprov. Det förhållande som gäller för råttor med ett primärt cellulärt immunsvaret i sjukdomens akuta fas, och ett ökat humoralt svar först i ett kroniskt skede skulle, att döma av mätningar av det humoral svaret hos experimentellt infekterade katter, även kunna gälla för dessa. Detta understryker vikten av en känslig diagnostik metod för att kunna detektera ett tidigt humoralt svar vid kliniskt konstaterbara symptom på neurologisk sjukdom och därigenom säkerställandet av en diagnos, vilken möjliggör adekvat behandling i sjukdomens akuta skede. De ovan beskrivna faktorerna medför att en infektion hos en katt är svår att konstatera och att in vivo diagnostik i praktiken är omöjligt. Målet för detta arbete har varit att utnyttja PLA-

teknikens förmåga att upptäcka femtomolara koncentrationer av en antikropp i blodet, vilken skulle medföra en drastisk ökning av sensitiviteten om den kunde appliceras på en diagnostisk metod.

Av vad som inledningsvis sades framgår att infektion med BDV och sjukdom av eller symptom från sådan infektion är ett i mycket svårgripbart och komplext fenomen där en del av problemen kring virusets förekomst och spridning ännu ej är helt lösta. Arbetet med att finna svar på dessa frågor skulle underlättas av en metod som utgjorde ett enkelt och säkert verktyg för att påvisa antigen eller antikroppar. En sjukdom där ett bra diagnostiskt verktyg saknas riskerar dessutom att försvinna från klinikernas medvetenhet. Ett säkert diagnostiskt verktyg är också nödvändigt vid prognostik och terapi. Det finns därför anledning att hoppas att försöken att finna en tillfredställande klinisk diagnostik för vingelsjuka hos katt snart når framgång.

TACK,

till Mikael Berg, Jonas J. Wensman och Anne-Lie Blomström för tålmodig handledning, samt övrig personal vid SLU/SVA som bistått med råd och dåd.

Tack också till Karin Hultin-Jäderlund för att jag fick vara med vid klinisk undersökning av neurologipatienter.

REFERENSER

- Berg, A.-L., R. Reid-Smith, M. Larsson, B. Bonnet. 1998. Case control study of feline Bornavirus disease in Sweden. *The veterinary record* 142, 715-717.
- Degiorgis M.-P., A.-L. Berg, C. Hård af Segerstad, T. Mörner, M. Johansson, M. Berg. 2000. Bornavirus disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *Journal of clinical microbiology* 38, 3087-3091.
- Fredriksson S., M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S.M. Gustafsdottir, A. Östman, U. Landegren. 2002. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nature biotechnology* 20, 473-477.
- Gustafsdottir S.M., E. Schallmeiner, S. Fredriksson, M. Gullberg, O. Söderberg, M. Jarvius, J. Jarvius, M. Howell, U. Landegren. 2005. Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses. *Analytical biochemistry* 345, 2-9.
- Helps C.R., N. Turan, T. Bilal, D.A. Harbour, H. Yilmaz. 2001. Detection of antibodies to Bornavirus disease virus in Turkish cats by using recombinant p40. *Veterinary record* 149, 647-650.
- Hilbe M., R. Herrsche, J. Kolodziejek, N. Nowotny, K. Zlinsky, F. Ehrensperger. 2006. Shrews as reservoir hosts of Bornavirus disease virus. *Emerging infectious diseases*. Vol. 12, No. 4, 675-677.
- Horii Y., J.N.P. Garcia, D. Noviana, F. Kono, T. Sawada, T. Naraki, K. Yamaguchi. 2001. Detection of anti-Bornavirus disease virus antibodies from cats in Asian countries, Japan, Philippines and Indonesia using electrochemiluminescence immunoassay. *Journal of veterinary medical science* 63, 921-923.
- Huebner J., L. Bode, H. Ludwig. 2001. Bornavirus disease virus infection in FIV-positive cats in Germany. *Veterinary record* 149, 152.
- Ihlenburg H. 1966. Experimentelle pruefung der empfänglichkeit der katze fuer das virus der Bornaschen krankheit. *Arch. Experim. VetMed.* 20, 859-864.
- Johansson M., M. Berg, A.-L. Berg. 2002. Humoral immune response against Bornavirus disease virus (BDV) in experimentally and naturally infected cats. *Veterinary immunology and immunopathology* 90, 23-33.
- Kamieh S., R.L.P. Flower. 2006. Bornavirus disease virus (BDV) infection in cats – a concise review based on current knowledge. *Veterinary quarterly* 28(2), 65-73.
- Kinnunen P.M., C. Billich, C. Ek-Kommonen, H. Henttonen, E.R.K. Kallio, J. Niemimaa, A. Palva, P. Staeheli, A. Vaheri, O. Vapalahti. 2007. Serological evidence for Bornavirus disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *Journal of clinical virology* 38 (1), 64-69.

- Kronevi T., M. Nordström, W. Moreno, P.O. Nilsson. 1974. Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nordisk veterinärmedicin*. 26, 720-725.
- Ludwig H., L. Bode. 2000. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 19 (1), 259-288.
- Lundgren A.-L. 1992. Feline non-suppurative meningoencephalomyelitis. A clinical and pathological study. *Journal of comparative pathology* 107, 411-425.
- Lundgren A.-L., H. Ludwig. 1993. Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta veterinaria scandiavica* 34, 101-103.
- Lundgren A.-L. 1995. Borna disease virus infection in cats: on the etiopathogenesis of feline non-suppurative meningoencephalomyelitis (staggering disease). *Doktorsavhandling vid Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala*. 103 sidor.
- Lundgren A.-L. A. Johannisson, W. Zimmerman, L. Bode, B. Rozell, A. Muluneh, R. Lindberg, H. Ludwig. 1997. Neurological disease and encephalitis in cats experimentally infected with Borna disease virus. *Acta neuropathologica* 93, 391-401.
- Nakamura Y., S. Asahi, T. Nakaya, M.K. Bahmani, S. Saitoh, K. Yasui, H. Mayama, K. Hagiwara, C. Ishihara, K. Ikuta. 1996. Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *Journal of clinical microbiology* 34, 188-191.
- Nishino Y., M. Funaba, R. Fukushima, T. Mitzutani, T. Kimura, R. Izuaka, H. Hiram, M. Hara. 1999. Borna disease virus infection in domestic cats: evaluation by RNA and antibody detection. *Journal of veterinary medical science* 61, 1167-1170.
- Nishino Y., D. Kobasha, S.A. Rubin, M.V. Pletnikov, K.M. Carbone. 2002. Enhanced neurovirulence of borna disease virus variants associated with nucleotide changes in the glycoprotein and L polymerase genes. *Journal of virology*. Vol. 76, No. 17, 8650-8658.
- Ouchi A., M. Kishi, T. Kobayashi, P.K. Lai, T.H. Malik, K. Ikuta, M. Mochizuki. 2001. Prevalence of circulating antibodies to p10, a non-structural protein of the Borna disease virus in cats with ataxia. *Journal of veterinary medical science* 63, 1279-1285.
- Poenisch M., N. Burger, P. Staeheli, G. Bauer, U. Schneider. 2009. Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous system of newborn-infected rats. *Journal of Virology* 83(9), 4297-4307.
- Tomonga K., T. Kobayashi, I. Kazuyoshi. 2000. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes and infection* 4, 491-500.

Muntlig källa: Sara Fors, klinikveterinär, Bagarmossens regiondjursjukhus.